Abt Associates Inc.

Cambridge, MA
Lexington, MA
Hadley, MA
Bethesda, MD
Washington, DC
Chicago, IL
Cairo, Egypt
Johannesburg, South Africa

Estudios Toxicológicos en Roedores para Extrapolación en Humanos

Intensificación de la Industria Artesanal de la Laca Niij de Rabinal, B.V. y Búsqueda de Nuevos Mercados

Guatemala-CAP Income Generation Activities Project (AGIL)

Implemented by:
Abt Associates Inc.
#520-C-00-00-00035-00

April 2002

Prepared for
United States Agency for International Development/ Guatemala
1A Calle 7-66, Zona 9
Guatemala City, Guatemala

Abt Associates Inc.
Suite 600
4800 Montgomery Lane
Bethesda, MD 20814-5341

Prepared by
Dr. Ana Lucía Valle

ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS EN ROEDORES PARA EXTRAPOLACIÓN EN HUMANOS

INFORME FINAL

De acuerdo a la

Propuesta presentada por: Dr. Charles MacVean,
Licda. Catherine Cardona y Lic. Pablo Mayorga

Intensificación de la industria artesanal de la laca niij de Rabinal, B. V. y búsqueda de nuevos mercados

AGIL

Dra. Ana Lucía Valle
Consultora

Abril, 2002

INTRODUCCIÓN

El presente estudio Toxicológico utilizando animales de experimentación, para posterior extrapolación a humanos, se hizo necesario para demostrar la inocuidad de la laca Niij y así dar continuación al Plan de Trabajo indicado en la propuesta "Intensificación de la industria artesanal de la laca niij de Rabinal, B. V. y búsqueda de nuevos mercados".

La evaluación de la laca Niij se realizó de varias formas, comenzando por la incorporación de la misma en la dieta de los animales como factor o suplemento aditivo a la misma. De esta forma se evaluaron diversos parámetros para determinar cualquier cambio, signo o síntoma de toxicidad que pudiese aparecer en los animales experimentales inmediatamente después de administrada esta sustancia y durante períodos de tiempo preestablecidos por el investigador.

Los estudios de toxicidad aguda proporcionan un estimado cuantitativo de la toxicidad (DL_{50}) en comparación con otras sustancias, identifican órganos blanco y otras manifestaciones clínicas de toxicidad aguda, establecen la reversibilidad de la respuesta tóxica y proporcionan un rango de dosis para una futura guía en estudios posteriores

El estudio experimental de toxicidad subcrónica debe hacerse únicamente después de realizado un estudio cuidadoso de la toxicidad aguda y cálculo de la dosis letal media en animales de experimentación.

Es importante que el investigador considere los factores que podrían afectar a los animales experimentales y reducir las variables asociadas con los mismos.

En el presente informe se describen las actividades de investigación realizadas y los resultados obtenidos en dicho estudio.

ANTECEDENTES

En un estudio toxicológico utilizando animales experimentales es necesario considerar todos los factores endógenos (genéticos), así como exógenos (del medio ambiente) que pueden modificar en algún momento la respuesta de estos animales al ser expuestos a distintas sustancias o compuestos.

Una nutrición adecuada influye grandemente en la forma que los animales experimentales alcanzan un óptimo crecimiento, reproducción y respuesta al estímulo.

Existen dos tipos de dieta bastante estudiadas, una de acuerdo a los ingredientes naturales y otra dietas purificadas. Ambas deben contener esencialmente: proteína (generalmente caseína), grasa, vitaminas, carbohidratos y fibra. Todos los animales deben recibir una dieta que sea adecuada a sus requerimientos y de calidad y cantidad adecuada para preservar su salud.

TOXICIDAD AGUDA

El primer examen toxicológico realizado con un producto nuevo es la toxicidad aguda. La dosis letal media o DL_{50} así como otros efectos tóxicos son determinados luego de administrar el compuesto por una vía adecuada a las especies animales experimentales.

Se tabula el número de animales que mueren en un período e 14 días después de la administración de una dosis simple. Adicionalmente, se monitora el peso diario y consumo de alimento por parte de los animales experimentales, así como un examen minucioso de los signos de intoxicación.

La conducción de procedimientos invasivos, i.e., cirugía, autopsia en animales debe realizarse bajo condiciones asépticas y en instalaciones adecuadas para dicho propósito.

Los procedimientos que puedan causar más allá de un dolor momentáneo o mínimo en el animal, deben ser practicados bajo sedación, analgesia o anestesia apropiada de acuerdo con prácticas veterinarias aceptadas.

Debe realizarse una autopsia en los animales experimentales y deben ser observados macroscópicamente los órganos nobles como corazón, riñones, pulmones e hígado. Si existe daño a nivel macroscópico, estos órganos deben ser observados macroscópicamente.

Durante este período se realizaron observaciones de signos y síntomas toxicológicos de los grupos tratados con cera Niij, asimismo se prepararon los animales para autopsias y observación macroscópica, así como un estudio histopatológico de los órganos principales o blanco. Estos resultados y observaciones se compararon con un grupo control.

Se tabula el número de animales que mueren en un período e 14 días después de la administración de una dosis simple. Adicionalmente, se monitora el peso diario y consumo de alimento por parte de los animales experimentales, así como un examen minucioso de los signos de intoxicación.

Debe realizarse una autopsia en los animales experimentales y deben ser observados macroscópicamente los órganos nobles como corazón, riñones, pulmones e hígado. Si existe daño a nivel macroscópico, estos órganos son observados microscópicamente.

Se observaron los signos y síntomas toxicológicos de los grupos tratados con cera Niij, asimismo se prepararon animales para autopsias y observación macroscópica, así como un estudio histopatológico de los órganos principales o blanco y un estudio histológico completo. Estos resultados y observaciones se compararon con un grupo control.

Fue importante conducir un análisis hematológico y examen microscópico de muestras de tejidos de aquellos animales tratados experimentalmente y del grupo control.

Los cambios morfológicos en células dañadas letalmente o en forma reversible pueden ser examinados microscópicamente. Algunas de estas alteraciones en el daño reversible incluye: hinchamiento celular y cambio en niveles de grasa, con inclusión de vacuolas.

El análisis microscópico de tejidos muestra la condición de los mismos luego de haber sido expuesto el animal a un exógeno, como la cera Niij.

Los órganos corporales del animal pasan por un período de adaptación celular y reparo en caso el compuesto llegue a causar alguna alteración leve. Si este compuesto es más agresivo puede llegar a alterar la permeabilidad de la membrana celular, o bien crear un desbalance homeostático o enzimático, para citar algunos ejemplos.

En la muerte celular o necrosis, pueden observarse procesos como digestión enzimática de la célula y desnaturalización de proteínas. Los daños mayores ocurren en el núcleo, como la decoloración de la cromatina o cariolisis y la disminución del núcleo o picnosis, o segmentación del núcleo llamado cariorrexis.

Asimismo, pueden encontrarse atrofia o hipertrofia celular en el intento de la adaptación del tejido al daño producido por una sustancia química. La presencia

de hialina, una sustancia homogénea, vidriosa, de color rosado que aparece en los tejidos, es indicativa de daño celular.

Los sitios celulares de daño hepático han sido analizados con bastante interés en los últimos cincuenta años. Los mecanismos de acción tóxica de muchos compuestos aún están siendo estudiados. Sin embargo, han recibido atención los organelos como mitocondria, retículo endoplasmático y lisosomas, así como alteraciones en permeabilidad de membrana celular. Se utilizan actualmente varios parámetros bioquímicos para detectar la disfunción o daño hepático en humanos y animales de laboratorio (Plaa and Hewitt, 1989).

En el presente estudio los cambios morfológicos fueron correlacionados con cambios en niveles sanguíneos de enzimas y otros sustratos.

La sangre es el fluido corporal más frecuentemente utilizado para propósitos analíticos. Si la sangre proviene de las arterias, es esencialmente uniforme en su composición a través del cuerpo (Henry J.B, 1991).

Es importante la evaluación de enzimas y de iones así como de otros compuestos (aminoácidos) en la sangre para poder detectar cualquier cambio fisiológico que incluye daño celular y tisular. Por ejemplo, un aumento en las enzimas aminotransferesas es un indicativo de daño hepático y el aumento de niveles de creatinina puede estar asociado a una condición de daño renal.
El análisis de niveles enzimáticos en el suero puede ser un buen índice de la salud de un animal. Por ejemplo, niveles altos de glucosa son indicativos de diabetes melitus, daño renal y hepático. Niveles altos de la enzima alanino aminotransferasa (SGPT) pueden observarse en diversas formas de daño hepático. Por otro lado, el aumento de la enzima aspartato aminotransferasa (SGOT) puede observarse en daño cardiaco, hepático, muscular o renal, ya que esta enzima esta ampliamente distribuida en estos tejidos.

Los niveles de nitrógeno urea sanguínea indican la perfusión renal, nefritis crónica, obstrucción en el tracto urinario, etc. Niveles sanguíneos altos de fosfatasa alcalina son indicativos de daño hepático. Un aumento de los niveles de calcio pueden ser debidos a un daño renal.

Se realizó un análisis bioquímico del suero de animales experimentales y examen microscópico de los órganos blanco, así su comparación con el grupo control.

Uno de los propósitos para realizar estudios de laboratorio en suero de animales experimentales es para detectar una enfermedad o cambios que pueden darse a nivel tisular en diversos órganos. Los valores de referencia se obtienen generalmente de sujetos saludables. La población control de estos animales la constituían ratas de peso similar. A continuación se presentan los diversos compuestos que fueron medidos y su relación con el metabolismo y posible daño cuando los niveles plasmáticos de los mismos se encuentran alterados.

Glucosa: niveles altos de glucosa indican una diabetes mellitus insulina dependiente o no, inflamación como pancreatitis, tumores pancreáticos, enfermedad renal o enfermedad hepática. Niveles bajos pueden presentarse en ayuno normal, neoplasmas extra pancreáticos, hipopituitarismo y enfermedad hepática.

Calcio: el calcio es el quinto elemento más abundante en el cuerpo y juega un papel importante en la homeostasis, y en procesos fisiológicos básicos como coagulación de la sangre, conducción neuromuscular y excitabilidad del músculo cardíaco y esquelético. Asimismo, está relacionado con la preservación de la integridad y permeabilidad de la membrana celular. El calcio existe en el plasma en tres diferentes formas: libre o ionizado (50%), acomplejado con aniones (5%), y unido a proteínas plasmáticas La acidosis aumenta el calcio ionizado Una elevación en el calcio plasmático puede ser indicativo de un hiperparatiroidismo, intoxicación por vitamina D, o enfermedad de Paget, una disminución de los valores de calcio pueden dar una acidosis renal, hipoparatiroidismo.

La actividad de la fosfatasa alcalina está presente en el hígado, hueso, intestino y riñón. Un aumento de la fosfatasa alcalina se presenta cuando el flujo biliar está comprometido o existen tumores. Asimismo, un aumento puede indicar desórdenes del tracto intestinal, cirrosis, daño renal, deficiencia de vitamina D y displasia fibrosa.

Nitrógeno: los valores de nitrógeno en el suero son un índice de la función renal y concentración de aminoácidos. La urea es el producto mayor del catabolismo proteico, se genera en el hígado de donde pasa a la sangre y luego es excretada por los riñones. La azotemia es una designación bioquímica de aumento de las concentraciones de compuestos nitrogenados en el plasma. Se debe principalmente a una disminución de la filtración glomerular como consecuencia de una enfermedad renal crónica, deshidratación o edema.

Creatinina: se forma como resultado de una deshidratación no enzimática de la creatina muscular. La creatinina libre no es reutilizada por el metabolismo del cuerpo y funciona como un producto de desecho de la creatina. La creatinina se filtra por el glomérulo pero no es reabsorbida bajo condiciones normales. Sin embargo, en condiciones de diabetes mellitus y enfermedades cardíacas, se ha observado reabsorción de la misma. Las concentraciones séricas de creatinina son relativamente constantes en comparación con las concentraciones de creatina. Un aumento en los niveles de creatinina son indicativos de una disminución de la función renal.

TGO: Glutamate oxaloacetate Transaminase o Aspartato aminotransferasa (AST). Esta enzima se eleva en enfermedades en las cuales los tejidos involucrados la contienen: infarto del miocardio, arritmias, hepatitis aguda, cirrosis, ictericia obstructiva, lesiones hepáticas, infarto pulmonar, pancreatitis aguda.

TGP: Glutamate Pyruvate Transaminase o alanina aminotransferasa (ALT). Se encuentra elevada en pacientes con necrosis hepática, es útil en el diagnostico de destrucción hepatocelular.

TOXICIDAD SUBCRÓNICA

Dicho estudio proporciona información acerca de los riesgos potenciales para la salud, que resulta de una exposición, de preferencia oral, de dosis repetidas de una sustancia en un tiempo limitado, que abarca el examen de los animales durante un período comprendido entre los 30 al 90 días, luego de haber tratado los animales con la cera Niij (en este caso) y comparado los animales con un grupo control.

El efecto nefasto que pudiera ser producido en el animal experimental resultante de la exposición repetida diaria de la cera se puede atribuir al aumento de la concentración de dicha sustancia o de sus metabolitos en los tejidos sensibles.

De igual manera que para el estudio de toxicidad aguda, es importante observar los signos y síntomas posibles de toxicidad en los animales que recibieron el tratamiento con diferentes dosis y comparadas con el grupo control.

La dosis que se utilizan en un estudio de toxicidad subcrónica son calculadas en base a los resultados obtenidos en el estudio agudo.

Asimismo, se analizan los tejidos tanto a nivel macroscópico como a nivel celular luego de haber sido expuesto el animal a un exógeno, como la cera Niij.

Los resultados pueden ser resumidos en tablas (ver anexo) que muestran para cada grupo de ensayo, el número de animales en el inicio del experimento, los que tuvieron lesiones, y el porcentaje de animales afectados. Cualquier método estadístico internacionalmente conocido puede ser utilizado.

Los cambios como hiperplasia (aumento del número de células de un órgano), metaplasia (sustitución de un tipo de célula diferenciada por otro) o displasia (pérdida en la uniformidad de células individuales y de su arquitectura y orientación), son indicativos de alteraciones producidas por efectos tóxicos de una sustancia al ser incorporada en el organismo.

Estos cambios son comparativos en animales experimentales (mamíferos, ratas) y humanos. La muerte celular, indicada muchas veces por un núcleo picnótico, o bien por disminución del número de células o cambios en la forma y contenido de las misma, es un signo claro de toxicidad producida por un compuesto.

Los cambios tisulares y celulares de los órganos más probables de sufrir daño fueron estudiados al ser expuestos a la cera Niij. Estos resultados fueron comparados con las alteraciones de niveles sanguíneos de enzimas y electrolitos y del tratamiento recibido por los animales experimentales.

Las variables que se analizaron en el presente estudio fueron: cambios en el peso de los animales, los cambios a nivel hematológico (alteración de niveles de enzimas, de iones y otros compuestos involucrados en daño tisular y de órganos), cambios histopatológicos y su correlación con la cantidad de cera Niij ingerida por cada animal experimental, perteneciente a cada uno de los tres grupos que recibieron tratamiento con la cera y al grupo control.

Para el análisis de los resultados obtenidos hasta la fecha, se eligió el Programa SPSS por computadora-

TOXICIDAD DÉRMICA

Una etapa importante en la evaluación de la toxicidad de una sustancia o compuesto químico es determinar las posibles propiedades irritantes y/o de efectos corrosivos sobre la piel de mamíferos (test de Draize).

Se define como irritación dérmica a la producción de alteraciones inflamatorias, sobre la piel en forma reversible, como consecuencia de la aplicación de una sustancia.

La corrosión dérmica es la producción de daños irreversibles sobre la piel como consecuencia de la exposición anteriormente descrita.

Cuando se estudia el efecto agudo de irritación primaria de la piel de una sustancia, debe conocerse sus propiedades químicas, características de solubilidad, punto de fusión y pH. Esta sustancia es aplicada en dosis única sobre la piel de los animales experimentales y cada uno de estos animales posee su propio control.

Se registraron, a intervalos pre-establecidos, el grado de irritación y otros efectos observados en una tabla de resultados. La duración del período de observación fue en promedio de unos 14 días.

Los artesanos que trabajan con la cera Niij tienen contacto directo con ella al manipularla con las manos. Es por ello que se hace necesario evaluar la toxicidad de esta cera a nivel dérmico, utilizando para ellos conejos como animales experimentales.

Los resultados pueden ser extrapolados a humanos.

CONDICIONES EXPERIMENTALES

i. **Bioterio**:

1.1 Se supervisaron las áreas del bioterio para determinar el cumplimiento de las condiciones óptimas de alojamiento de animales, en cuanto a temperatura, iluminación, ventilación y humedad del ambiente, así como ausencia de ruido. Todas estas condiciones se cumplen en el bioterio del INCAP por lo que no hubo necesidad de realizar ningún cambio o innovación.

1.2 El suministro de agua y alimentación de los animales fueron revisados y se confirmó que los mismos cumplen con las normas de buenas prácticas de manejo de animales experimentales.

1.3 Las condiciones de sanidad del bioterio fueron confirmadas.

ii. **Animales Experimentales**:

2.2.1 Se realizó el apareamiento con ratas Sprague Dawley para la procreación de los animales necesarios para la realización de este estudio de toxicidad, siguiendo procedimientos y alojamiento de animales adecuados para este propósito.

2.2.2 Se elaboraron hojas de control para los cambios que pudieran presentar los animales después de recibir el tratamiento. Así también hojas de identificación y control de animales que se incluirán en los reportes.

2.2.3 La fecha de inicio de cada una de las fases experimentales de este estudio toxicológico fue revisada y confirmada, estableciendo horarios de revisión de animales tratados y grupo control.

2.2.4 Los cuidados de los animales durante los fines de semana y feriados fueron especificados de común acuerdo con los personeros de INCAP para satisfacer con los requerimientos de la investigación. Se estableció un procedimiento para los cuidados en estas condiciones y en los casos de una emergencia.

iii. Histopatología

3.1 El material, reactivos y equipo que se utilizaron para realizar los análisis histopatológicos en la Universidad del Valle de Guatemala, fueron establecidos en común acuerdo con los responsables del laboratorio de histopatología.

3.2 Se procedió a cotizar el material para la óptima conducción del estudio histopatológico de los órganos blanco de los animales sometidos al tratamiento con grasa Niij.

3.3 Se elaboraron fichas técnicas para el registro de datos del análisis histopatológico que indican entre otros: identificación del animal, tipo de órgano, tipo de análisis, nombre del responsable de dicho análisis, observaciones, etc.

iv. Fase Preliminar con Animales Experimentales:

4.1 De acuerdo a las dietas básicas suministradas a animales experimentales en estudios con sustancias grasas, se procedió a seleccionar una dieta que contiene caseína como fuente de proteínas, almidón de maíz (carbohidratos), minerales, aceite de hígado de bacalao (grasa) y una solución de vitaminas.

4.2 Se trabajó con un grupo de ratas a las cuales se les administró una dieta que contenía la laca Niij para observar la respuesta de los animales en el consumo del alimento.

4.3 Se observaron a los animales tratados y se llevó un control de pesos comparado con un grupo control.

4.4 Una vez confirmada la aceptación de los animales con respecto a esta dieta se procedió a comenzar la primera fase de este estudio.

5. Fase I:

Si se trabaja con una sustancia que es considerada poco tóxica, es permitido administrar a los animales una dosis alta de 5 gramos por kilogramo de peso y observar los efectos por un período de 7 días determinando así cuáles serían las dosis posteriores a estudiar.

5.1 Se les incorporó la laca niij como elemento adicional en la dieta de un grupo experimental de 8 ratas Sprague Dawley.

5.2 Un grupo control de 8 ratas también fue seleccionado y tratado con una dieta similar pero sin la incorporación de la laca.

5.3 Los pesos de los animales fueron registrados todos los días para observar cualquier cambio en el consumo de la dieta.

5.4 Asimismo se observaron cualquier cambio en comportamiento y cualquier signo de toxicidad a los 30, 60, 120, 240, 360 minutos y 12 y 24 horas después de habérseles tratado a los animales con la dieta descrita anteriormente.

5.5 Dichas observaciones continuaron por 7 días más, tanto para el grupo tratado como para el grupo control.

5.6 Se procedió luego a disectar a un número predeterminado de animales tanto del grupo control como del tratado y se observarán macroscópicamente los distintos órganos (corazón, riñones, hígado, bazo) y se determinaron los pesos.

Material de histopatología

Se procedió a comprar el material, reactivos y equipo que se utilizaron para los análisis histopatológicos en la Universidad del Valle de Guatemala, de acuerdo a cotizaciones previas.

6. Fase II:

En esta fase, se trabajó con los grupos de animales experimentales tratados con diferentes concentraciones de cera Niij y se compararon con el grupo control.

Se anotaron los posibles signos de toxicidad aguda y cambios de comportamiento de los animales experimentales tratados durante un tiempo de 14 días, según el registro en tablas apropiadas para tal efecto (ver Anexo presentado en el informe anterior).

El comportamiento y condición física de los animales tratados, así como el peso de los mismos fueron comparados diariamente con el grupo control por un tiempo de 14 días.

Análisis hematológico

- Se tomaron muestras de sangre del 30% de los animales de los grupos tratados y control. Para ello se practicó una de punción cardíaca, utilizando una jeringa con aguja desechables.
- Dichas punciones se realizaron luego de anestesia profunda de los animales en cámaras con éter.
- La sangre colectada (aproximadamente dos mililitros por animal) fue colocada en dos tubos (por cada animal) uno de ellos heparinizado.
- Las muestras sanguíneas fueron llevadas al laboratorio para su análisis hematológico completo.

Histopatología de organos blanco

- Luego de tomar las muestras sanguíneas de los animales descritos anteriormente, se procedió a realizar una autopsia y disección de los órganos blanco.
- Estos órganos fueron sumergidos en solución salina y luego pesados en forma individual.

- Posteriormente, se realizó una observación macroscópica para identificar posibles daños al tejido y luego los órganos fueron colocados en solución de formaldehído al 30%, en frascos de vidrio debidamente identificados.

- Los órganos se procesaron para un análisis histopatológico completo.

7. Fase III - Estudio de Toxicidad Subcrónica:

El desarrollo de esta fase comprendió la utilización de ratas Sprague Dawley a las cuales se les administró diferentes concentraciones de cera Niij y se compararon con el grupo control durante un período de 90 días.

Los posibles signos de toxicidad y cambios de comportamiento de los animales experimentales tratados fueron registrados, tal como se indicó para el estudio agudo.

Los animales fueron mantenidos con dieta libre y observados periódicamente luego del período de tratamiento con la cera Niij.

Histopatología de órganos blanco

- Se procesaron los órganos disectados de animales experimentales y grupo control.

- Dichos órganos fueron mantenidos en solución de formaldehído al 30% y luego fueron embebidos en parafina.

- Se realizaron cortes con micrótomo de los bloques de parafina.

- Los cortes fueron teñidos con hematoxilina/eosina para su posterior observación y análisis microscópico.

8. Fase IV Estudio de Toxicidad Dérmica

Procedimientos previos:

Antes de la aplicación de la cera Niij, los pelos de la región dorsal del tronco de los conejos fueron depilados. Se escogieron tres sitios de aplicación, uno de los cuales fue sometido a procedimientos abrasivos, sin producir sangramiento.

Animales experimentales

Se escogieron cuatro conejos albinos adultos, sanos. Estos animales fueron mantenidos en jaulas individuales a temperatura de 25 ± 5 °C, con períodos de claro-oscuro de 12 horas. Los animales tuvieron dieta libre y se les suministró agua potable.

Ejecución del ensayo

La cera Niij fue aplicada sobre una superficie de piel de aproximadamente 4 cm^2 . El área fue cubierta con una gaza estéril fijada con esparadrapo hipoalergénico. La duración de la exposición fue de cuatro horas.

La observación de los síntomas de edema y eritema en los animales y el registro de la respuesta fue realizada a los 60 minutos, 24 y 48 horas después de retirar la cera de la piel. Se realizó una última observación a los 7 días para caracterizar la reversibilidad de la respuesta.

Ordenamiento, Clasificación y Análisis de Datos:

Se procedió a ordenar y clasificar los datos obtenidos del estudio hematológico y se ingresaron los mismos a hojas master para su comparación con diferentes variables en cada uno de los grupos de animales experimentales.

RESULTADOS

HISTOPATOLOGÍA DE ORGANOS

Se estudiaron todas las láminas conteniendo los tejidos hepático, pancreático, cardíaco y renal de los animales experimentales tratados con cera Niij y fueron comparados con el grupo control.

El análisis microscópico de las láminas conteniendo las secciones transversales de tejido de los órganos disectados muestra lo siguiente:

La comparación morfológica de los órganos provenientes de animales tratados con cera Niij y aquellos de animales controles indica que no existen daños aparentes en los tejidos analizados microscópicamente. No se observaron alteraciones en cuanto a forma celular, cambio o desaparición de organelos, núcleo celular, etc

Estos tejidos incluyen: hígado, corazón, riñón y páncreas.

Estas observaciones fueron relacionadas con los valores bioquímicos descritos con anterioridad.

Se completó la Fase III o subcrónica satisfactoriamente sin mortandad de animales ni signos de toxicidad o cambios de comportamiento.

Estos datos fueron analizados con el Programa Estadístico SPSS.

En Anexos se presentan las gráficas en las cuales se compara la ingesta de cera Niij (mg) con los diferentes compuestos presentados como valores séricos. Asimismo, se muestra la relación entre el peso de diversos órganos: hígado, riñón, corazón y páncreas y la ingesta de cera Niij.

Obsérvese que en las gráficas no existe una relación entre el consumo de la cera y los valores de glucosa, calcio, nitrógeno, creatinina, fosfatasa alcalina, TGO y TGP.

La correlación puede también observarse en los resultado mostrados en Anexos utilizando el programa SPSS en el cual se comparan entre sí, todos los valores de ingesta (en miligramos) de cera Niij, creatinina, glucosa, nitrógeno, TGO, TGP, Fosfatasa, Creatinina y pesos de los órganos estudiados.

ANEXO No. 1

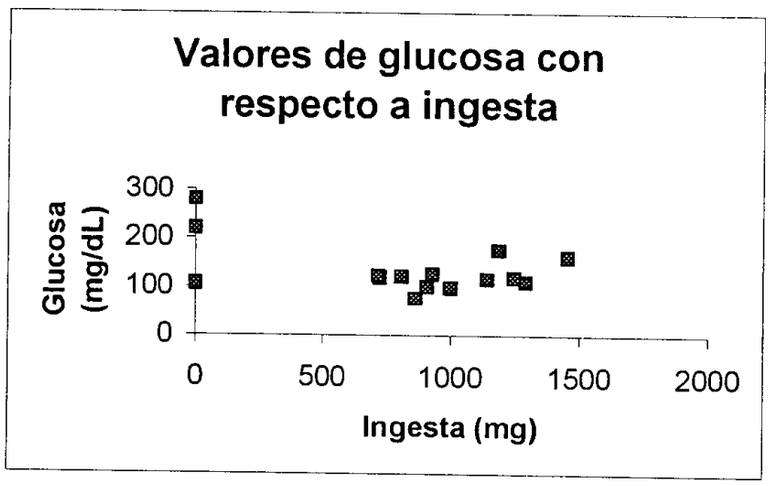
TOXICIDAD AGUDA

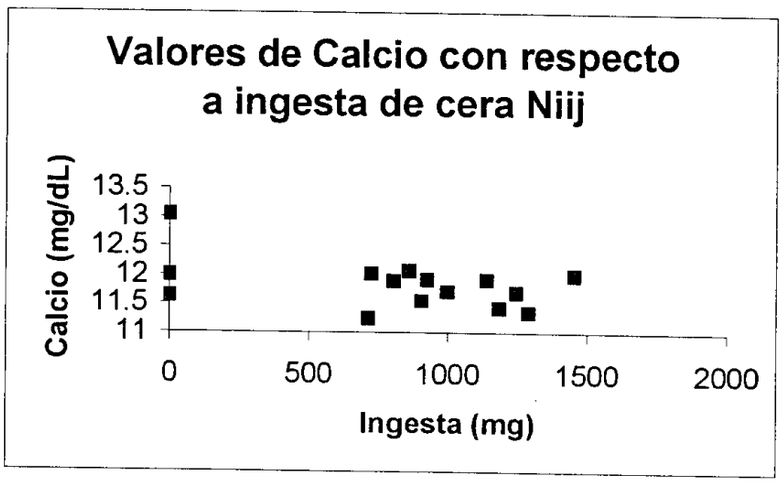
SIGNO	ANIMAL No.	ANIMAL No.	ANIMAL No.	ANIMAL No.
Actividad general				
Irritabilidad				
Respuesta al toque				
Sensibilidad de la cola				
Contorsiones				
Costado				
Enderezamiento				
Tono corporal				
Fuerza de agarre				
Ataxia				
Reflejo auricular				
Reflejo córneo				
Tremor				
Convulsiones				
Estimulación				
Estrabismo				
Hipnosis				
Anestesia				
Lacrimación				
Ptosis palpebral				
Micción				
Defecación				
Piloerección				
Hipotermia				
Respiración				
Cianosis				
No. De muertos				

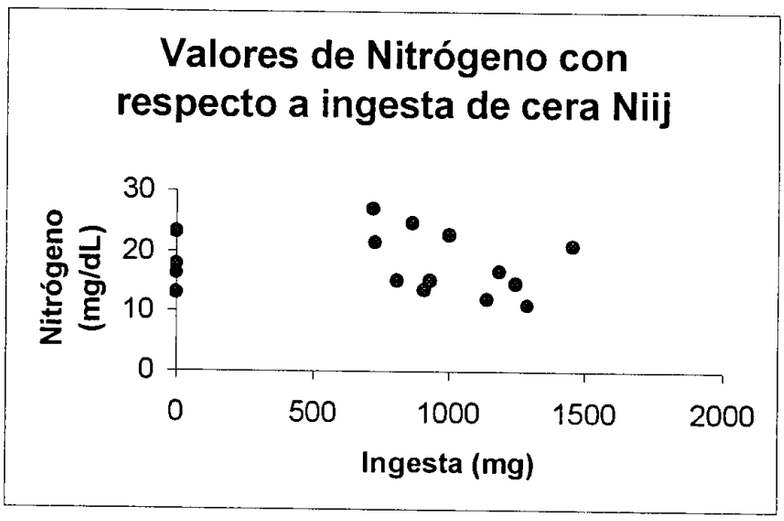
ANEXO No. 2

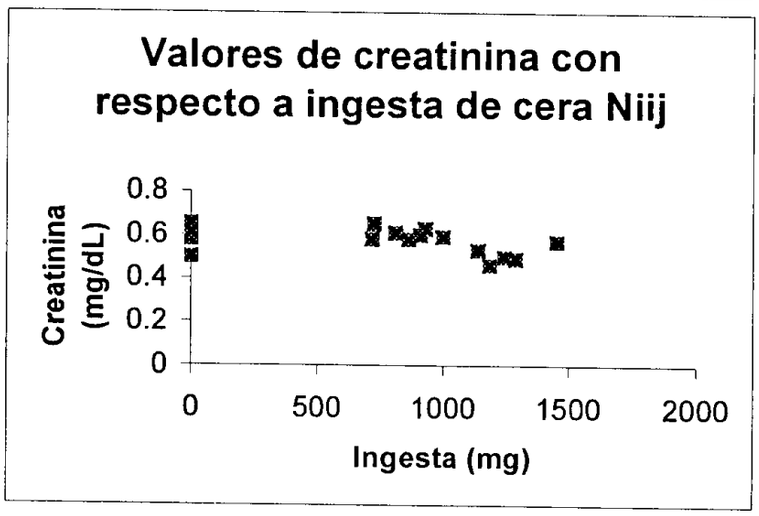
GRUPO	Número	Ing (mg)	SEXO	Peso i	Peso f	GLUCOSA	N	CREATI	A/G	TGO	TGP	Pasa	Ca
1	5	728	2	184	210	119	21.6	0.65	2.1	548	66	330	12.02
1	1	865	1	190	243	75	24.8	0.58	2.1	129	55	826	12.07
2	6	1000	2	172	209	97	22.9	0.59	2.7	186	56	304	11.71
2	8	720	2	156	184	123	27.1	0.58	2.4	1304	135	307	11.24
3	2	1455	1	186	221	162	21	0.57	2.1	928	110	565	12
3	4	1185	1	172	223	176	16.7	0.46	3.8	238	90	499	11.43
4	6	0	2	178	225	279	17.9	0.58	2	181	50	164	13.04
4	2	0	1	180	323	220	23.3	0.65	3	195	55		

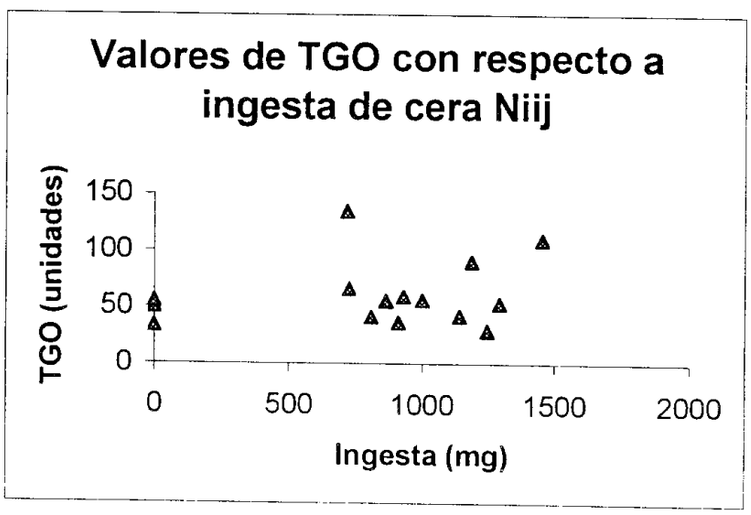
Ing: ingesta de cera en miligramos.
Peso i: peso inicial
Peso f: peso finalj
N: nitrógeno en urea
Creati: creatina quinasa
TGO: aspartato aminotransferasa
TGP: alanina aminotransferasa
Pasa: fosfatasa alcalina
Ca: calcio

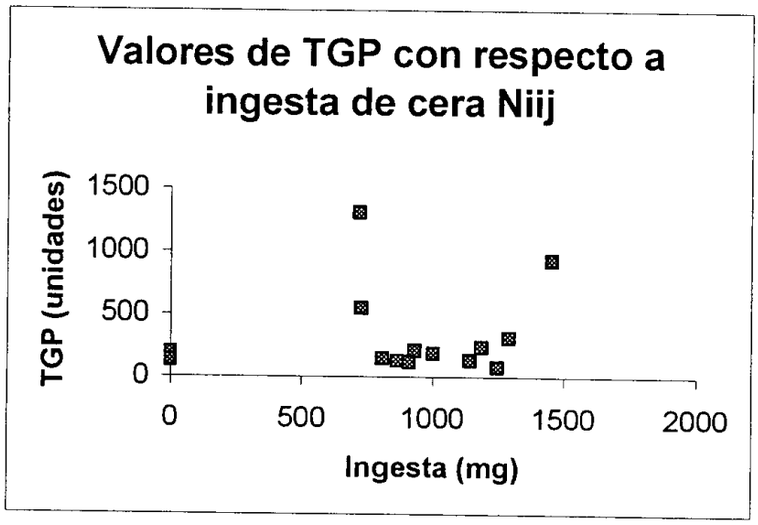

Valores de glucosa con respecto a ingesta
Glucosa (mg/dL)
300
200
100
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

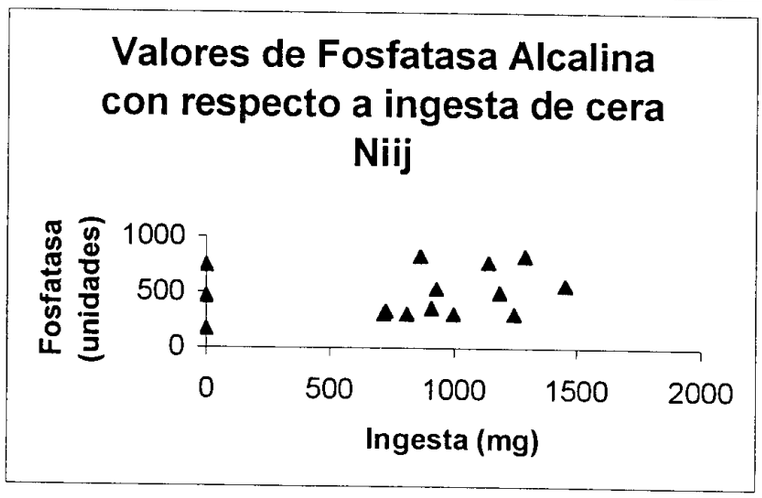

Valores de Calcio con respecto a ingesta de cera Niij
Calcio (mg/dL)
13.5
13
12.5
12
11.5
11
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

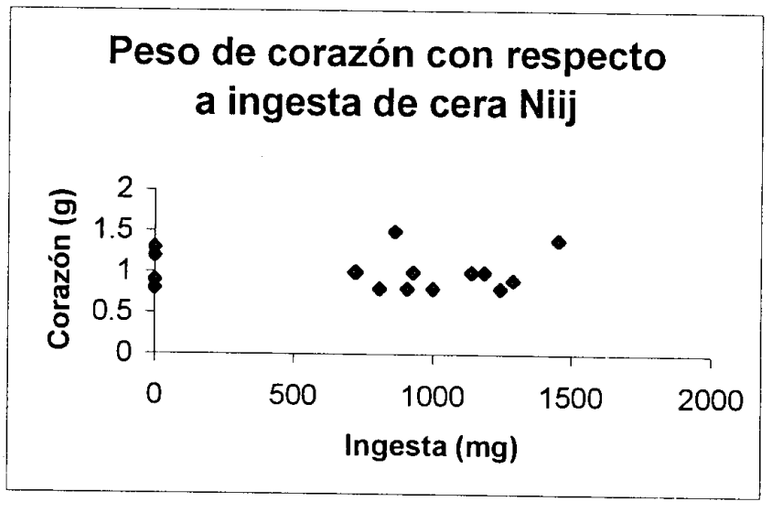

Valores de Nitrógeno con respecto a ingesta de cera Niij
Nitrógeno (mg/dL)
30
20
10
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

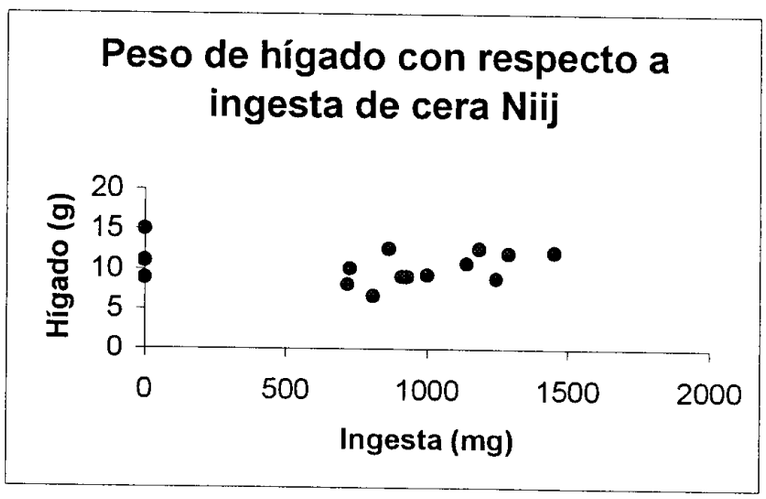

Valores de creatinina con respecto a ingesta de cera Niij
Creatinina (mg/dL)
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

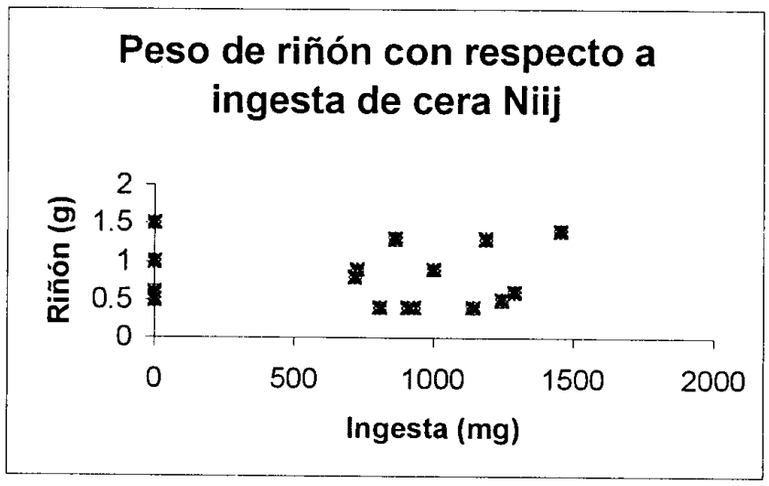

Valores de TGO con respecto a ingesta de cera Niij
TGO (unidades)
150
100
50
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

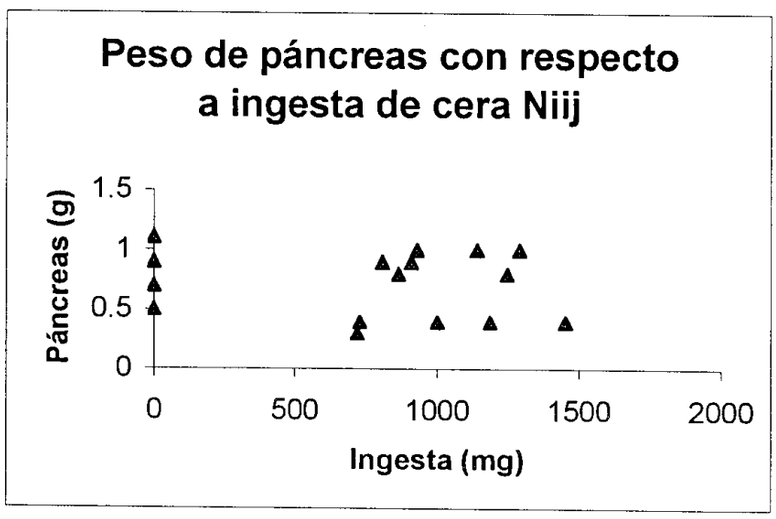

Valores de TGP con respecto a ingesta de cera Niij
TGP (unidades)
1500
1000
500
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)


Valores de Fosfatasa Alcalina con respecto a ingesta de cera Niij
Fosfatasa (unidades)
1000
500
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)


Peso de corazón con respecto a ingesta de cera Niij
Corazón (g)
2
1.5
1
0.5
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)


Peso de hígado con respecto a ingesta de cera Niij
Hígado (g)
20
15
10
5
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)


Peso de riñón con respecto a ingesta de cera Niij
Riñón (g)
2
1.5
1
0.5
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)


Peso de páncreas con respecto a ingesta de cera Niij
Páncreas (g)
1.5
1
0.5
0
0
500
1000
1500
2000
Ingesta (mg)

ANEXO No. 4

RESULTADOS DEL EXTUDIO DE TOXICIDAD DÉRMICA

IRRITACIÓN PRIMARIA DE LA PIEL

Eritema o escamas	Lectura (horas)	Conejos # 1	2	3	4	$\bar{X}$
Piel íntegra	1	0	0	0	0	0
	24	2	2	1	1	1.5
	48	2	2	1	1	1.5
Piel escarificada	1	1	1	1	1	1
	24	1	1	1	1	1
	48	1	1	1	1	1

Subtotal A = Σ de $\bar{X}$ = 6

Edema	Lectura (horas)	Conejos # 1	2	3	4	$\bar{X}$
Piel íntegra	1	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
Piel escarificada	1	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0

Subtotal B = Σ de X = 0

(A + B) / 4 = valor para clasificación de la siguiente manera:

(6 + 0) / 4 = 1.5 = irritante moderado

0.0 – 1.0 = no irritante
1.1 2.0 = irritante moderado
2.1 – 3.0 = irritante grave
3.1 – 4.0 = corrosivo

Interpretación de la numeración

Formación de Eritema y escaras

Lesión	**Valor**
Sin eritema	0
Eritema leve (apenas perceptible)	1
Eritema bien definido	2
Eritema moderado a grave	3
Eritema grave (violeta) con escaras	4

Formación de Edema

Lesión	**Valor**
Sin edema	0
Edema leve (apenas perceptible)	1
Edema bien definido (bordes < 1 mm)	2
Edema moderado (bordes de 1 mm)	3
Edema grave (bordes > 1 mm)	4

REFERENCIAS BIBILOGRÁFICAS

- Amdur, M.O. Doull, J, Klaasen C. D. Casarett and Doull"s TOXICOLOGY. 1991 Pergamon Press, 4a ed. NY, EEUU,. 1033 p.
- Brito, A.S. Manual de Ensaios Toxicológicos *in vivo*. 1994, Editora da Unicamp. Sao Paulo, Brasil. 122 p.
- Herny, J.B. Clinical Diagnosis & Management by Laboratory Methods. 1991. W.B. Sanders Co. 18th Ed., 1454 p.
- Leeson C.R, Leeson T.S, Paparo, A.A. Textbook of Histology. 5th ed. Saunders Co.: 1988, EEUU. 597p.
- Robbins, S.L. Basic Pathology. Saunders Co.: 1987. 787 p.